

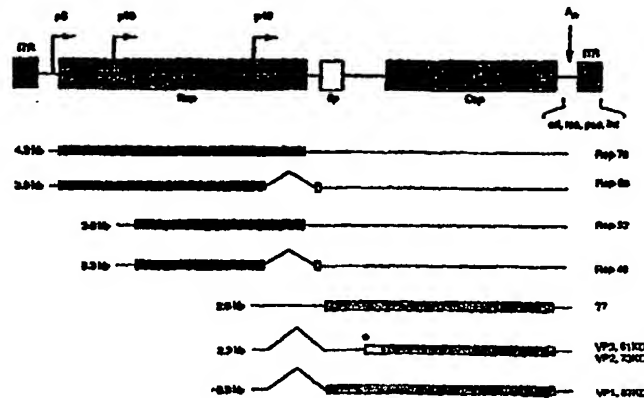


## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 7/01, 5/10, 15/63, 15/67, 15/86</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/00947</b>
			(43) Date de publication internationale: 9 janvier 1997 (09.01.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00968		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 20 juin 1996 (20.06.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/07570 23 juin 1995 (23.06.95) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LATTA, Martine [FR/FR]; 141, rue de Paris, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). ORSINI, Cécile [FR/FR]; 19, rue de la Voute, F-75012 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). PROST, Edouard [FR/FR]; 20, rue du Maréchal-De-Latre-de-Tassigny, F-94370 Sucy-en-Brie (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-Le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).			
(74) Mandataire: SAVINA, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).			

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES, USE THEREOF FOR PREPARING AAVS, COMPLEMENTARY CELL LINE, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAID ADENOVIRUSES

(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS, LEUR UTILISATION POUR PREPARER DES AAV, LIGNEE CELLULAIRE COMPLEMENTAIRE ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT



## (57) Abstract

A recombinant adenovirus in which the expression of a nucleic acid sequence coding for at least one homologous or heterologous gene of viral origin is placed under the control of an inducible promoter, is disclosed. The use of such recombinant adenoviruses for preparing AAVs, and a complementary cell line and preparation method therefor, are also disclosed. Furthermore, pharmaceutical compositions containing such an adenovirus are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un adénovirus recombinant dans lequel l'expression d'une séquence nucléique codant pour au moins un gène d'origine virale, homologue ou hétérologue, est placée sous contrôle d'un promoteur inductible. Elle se rapporte en outre à l'utilisation de ces adénovirus recombinants pour préparer des AAV, à une lignée cellulaire complémentaire et un procédé de préparation correspondants. Elle vise également des compositions pharmaceutiques contenant un adénovirus selon l'invention.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LR	Libéria	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
ER	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

ADENOVIRUS RECOMBINANTS, LEUR UTILISATION POUR PREPARER  
DES AAV, LIGNEE CELLULAIRE COMPLEMENTAIRE ET COMPOSITIONS  
PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux, leur préparation  
5 et leurs utilisations. Elle concerne également les compositions pharmaceutiques  
contenant lesdits vecteurs viraux.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie  
(mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique  
dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit  
10 in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite  
dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Dans ce second cas,  
différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection  
impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1  
(1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989)  
15 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de  
liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes  
est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de  
transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter  
20 certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS,  
etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

En ce qui concerne plus particulièrement les adénovirus, il s'agit de virus à  
ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend  
notamment une séquence inversée (ITR) à chaque extrémité, une séquence  
25 d'encapsidation, des gènes précoces et des gènes tardifs (Cf figure 1). Les principaux  
gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les  
gènes contenus dans la région E1 (E1a et E1b notamment) sont nécessaires à la  
réplication virale. Les régions E4 et L5 par exemple sont impliquées dans la

propagation virale et les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genbank M73260). De même des parties, voire la totalité du génome d'adénovirus de sérotypes différents (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées. Ces vecteurs viraux présentent avantageusement un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Compte tenu de leurs propriétés, ils ont déjà été utilisés pour le transfert de gènes in vivo. A cet effet, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes ( $\beta$ -gal, OTC,  $\alpha$ -1AT, cytokines, etc).

Bien entendu, l'ensemble de ces vecteurs viraux comportent de nombreux gènes viraux dont l'expression n'est en revanche pas souhaitable en thérapie génique. Il est impératif de contrôler in vivo la non expression de gènes viraux sauvages et/ou de protéines qui en dérivent et qui sont susceptibles d'induire une réponse immunitaire et/ou inflammatoire indésirable voire totalement néfaste à l'égard de l'organisme traité.

A ces fins, les constructions de vecteurs viraux actuellement proposées sont modifiées de manière à rendre lesdits vecteurs incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Ils sont dits défectifs. Généralement, le génome des virus défectifs est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par une séquence codant pour une molécule d'intérêt thérapeutique. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Dans le cas particulier des adénovirus recombinants, les constructions décrites dans l'art antérieur sont généralement des adénovirus délétés des régions E1 (E1a et/ou E1b) et éventuellement E3 au niveau desquelles sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). D'autres constructions comportent une délétion au niveau de la

région E1 et d'une partie non essentielle de la région E4 (WO 94/12649). Ces adénovirus recombinants défectifs peuvent être préparés de différentes façons mettant en oeuvre ou non une lignée cellulaire compétente capable de compléter toutes les fonctions défectives essentielles à la réplication de l'adénovirus recombinant.

5 Actuellement, les vecteurs dérivés des adénovirus sont généralement produits dans une lignée de complémentation (lignée 293) dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 contient l'extrémité gauche (environ 11-12 %) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'TTR gauche, la région d'encapsidation et la région E1, incluant E1a, E1b et une partie de la

10 région codant pour la protéine pIX. Cette lignée est capable de trans-complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, nécessaire à la réplication.

Toutefois, on ne peut totalement exclure lors de la production de ces vecteurs viraux défectifs la possibilité de recombinaisons générant des particules

15 virales répliquatives ou des transcomplémentations in vivo par des fonctions cellulaires de type E1. Il est évident que ce type d'évènement est totalement incompatible avec leur utilisation subséquente en thérapie génique. La présence, in vivo, de particules virales répliquatives peut avoir des conséquences très néfastes comme par exemple induire une propagation virale et provoquer une dissémination incontrôlée avec des

20 risques de réaction inflammatoire, de recombinaison, etc...

Parallèlement, il est impératif de prévenir in vivo l'expression de protéines virales correspondantes. Bien que ne présentant pas nécessairement un caractère toxique à l'égard de la cellule, elles sont également fortement indésirables car susceptibles également d'induire des réponses du système immunitaire de type

25 inflammation et/ou fièvres préjudiciables à l'égard de l'organisme traité. (D.Y. Schwarz, (1995), P.N.A.S 92, 1401-1405 ; J. F. Engelhardt, (1994), Human Gene Therapy, 5, 1217-1229 et (1994) P.N.A.S. 91, 6196-6200 ; Y. Yang, (1994), Immunity, 1, 433-442, (1995) J. Virol., 69, 2004-2015 et Nature Genetics, (1994) 7, 362-369).

La présente invention a précisément pour objet de proposer une solution permettant de remédier à ces inconvénients et s'avère tout particulièrement utile pour préparer des lots de virus de type adénovirus présentant une sécurité accrue car notamment dépourvus de particules virales répliquatives.

5 De manière inattendue, la demanderesse a mis en évidence qu'il était possible, à l'aide d'un système promoteur original, de contrôler efficacement l'expression des gènes viraux, expression qui est effective *in vitro* lors de la production virale mais en revanche inefficace ultérieurement, *in vivo*, lors de l'emploi thérapeutique desdits virus recombinants.

10 Plus précisément, la présente invention se rapporte à un adénovirus recombinant dans lequel l'expression d'au moins un gène d'origine virale, homologue ou hétérologue, est contrôlée par un promoteur inducible.

Au sens de la présente invention, on entend par promoteur inducible tout promoteur dont l'activité est initiée par la présence d'un agent chimique et/ou  
15 biologique extérieur, agent qui, dans le cadre de la présente invention présente en outre une toxicité réduite voire nulle. Par "extérieur", il est entendu que l'agent chimique et/ou biologique n'existe pas naturellement dans les cellules traitées avec l'adénovirus revendiqué.

A titre de promoteurs inducibles susceptibles d'être mis en oeuvre selon la  
20 présente invention, on peut notamment citer les promoteurs classiques tels que ceux répondant à des métaux lourds (CRC Boca Raton, FL (1991), 167-220 ; Brinster et al. Nature (1982), 296, 39-42), à des chocs thermiques, à des hormones, (Lee et al. P.N.A.S. USA (1988), 85, 1204-1208; (1981), 294, 228-232 ; Klock et al. Nature (1987), 329, 734-736 ; Israël & Kaufman, Nucleic Acids Res. (1989), 17, 2589-2604)  
25 ou à des agents chimiques de type glucose, lactose, galactose ou antibiotiques.

Tout récemment, il a été décrit un promoteur inducible par la tétracycline particulièrement avantageux dans le cadre de la présente invention.

Ce promoteur, dit promoteur inductible à la tétracycline, comprend un promoteur minimal lié opérationnellement à un ou plusieurs opérateur(s) de la tétracycline. C'est la liaison, aux séquences opérateurs de la tétracycline, d'une protéine dite "activateur de transcription", liaison qui ne s'établit qu'en présence de  
5 tétracycline ou un de ses analogues, qui permet l'activation du promoteur minimal et donc la transcription du ou des gènes viraux associés.

En ce qui concerne plus particulièrement la protéine dite activateur de transcription, elle se caractérise donc par son aptitude à se lier, en présence de tétracycline, aux séquences opérateurs du promoteur inductible par la tétracycline et  
10 sa capacité à activer le promoteur minimal. Plus préférentiellement, il s'agit d'une protéine constituée de deux polypeptides, un premier polypeptide qui se lie aux séquences tet opérateur, en présence de tétracycline ou d'un analogue de celle-ci, et un second polypeptide dont la fonction est plus spécifiquement d'activer ladite transcription. Le premier polypeptide de la protéine dite activateur de transcription  
15 est un répresseur de la tétracycline muté de manière à manifester un comportement inverse à celui d'un répresseur sauvage c'est-à-dire qu'il ne se lie aux séquences tet opérateurs qu'en présence et non en absence de tétracycline. Quant au second polypeptide, il s'agit préférentiellement du domaine d'activation de la protéine 16 du Virus Herpes Simplex.

20 Dans le cas où le promoteur inductible utilisé est par exemple inductible au glucose ou galactose, on peut envisager de mettre en oeuvre un activateur de transcription construit sur ce modèle c'est-à-dire par exemple Glu-VP16 ou Gal4-VP16.

25 Selon un mode préféré de l'invention, le promoteur inductible mis en oeuvre est un promoteur inductible à la tétracycline ou un de ses analogues tel que décrit ci-dessus.

Au sens de la présente invention, un promoteur inductible par la tétracycline comprend un promoteur minimal lié opérationnellement à une séquence dite de régulation comprenant au moins un opérateur de la tétracycline "tet opérateur" ou de  
30 l'un de ses analogues.

Par analogue de la tétracycline, on entend couvrir tout composé présentant des homologies structurales avec la tétracycline et étant capable de se lier à son récepteur lié au domaine de transactivation de la protéine dite activateur de transcription présentée ci-dessus, avec un  $K_a$  d'au moins environ  $10^6 M^{-1}$ . A titre  
5 d'analogues susceptibles d'être utilisés selon la présente invention on peut notamment citer la doxycycline, la chlorotétracycline et l'anhydrotétracycline.

Par promoteur minimal, on entend désigner toute séquence promotrice qui seule n'est pas capable d'assurer efficacement la transcription de la séquence d'ADN qui lui est associée. L'activité d'un tel promoteur s'avère totalement dépendante de la  
10 liaison de la protéine activateur de transcription à la séquence dite de régulation, en présence de tétracycline. En fait, ce promoteur minimal a surtout pour fonction d'orienter la transcription. Dans cette perspective, il est de préférence situé en amont de la séquence virale de manière à former avec elle une séquence nucléotidique continue.

15 Ce promoteur minimal peut dériver du promoteur immédiatement précoce du Cytomégalo virus humain et plus préférentiellement est compris entre les nucléotides +75 à -53 ou +75 à -31. Toutefois, il est également possible d'employer selon l'invention un promoteur minimal dérivant d'un promoteur conventionnel comme par exemple celui activant la transcription du gène codant pour la thymidine  
20 kinase.

Un promoteur conventionnel peut également être rendu minimal par le biais d'une ou plusieurs mutations génétiques qui le rendent incapable d'assurer seul efficacement la transcription du gène qui lui est associé. Il peut également être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention, un promoteur minimal dérivant  
25 directement du promoteur naturellement responsable de l'expression du gène viral considéré. On peut également envisager l'utilisation d'un promoteur dit "TATA-less" tel que décrit par E. MARTINEZ et al. (EMBO Journal, (1994), 13, N°13, 3115-3126) de manière à obtenir un bruit de fond le plus basal possible dans la situation non induite.



De manière générale, ce promoteur minimal est placé en amont de la séquence nucléotide dont il contrôle l'expression, en substitution ou non de son promoteur naturel. Le propre promoteur de la séquence nucléique peut en effet demeurer présent mais sous une forme inactivée ou rendue non fonctionnelle par différentes techniques connues de l'homme de l'art et notamment par suppression, délétion et/ou addition d'une ou plusieurs bases.

Selon un mode particulier de l'invention, le promoteur minimal dérive du promoteur minimal de la thymidine kinase du Virus Herpès Simplex (Mc Knight et al. (1984) Cell 37:253-262). Il est alors désigné par Tk.

Plus préférentiellement, il est représenté en tout ou partie par l'une des séquences représentées en SEQ ID N° 1 ou N° 2 ou l'un de leurs dérivés.

Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute séquence obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de séquences données et conservant l'activité recherchée. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs acide nucléique.

En ce qui concerne la séquence dite de régulation, elle comprend au moins un opérateur de la tétracycline ou l'un de ses analogues. Le ou les opérateurs sont reconnus par l'activateur de transcription en présence de tétracycline et permettent donc de ce fait l'activation du promoteur minimal.

Les séquences tet opérateur pouvant être mises en oeuvre peuvent notamment être choisies parmi celles décrites par Hillen & Wissemann (Protein-Nucleic Acid Interaction, Saeger & Heinemann, eds., Macmillan, London, (1989), 10, 143-162), Waters et al. (Nucleic Acids Res. (1983), 11, 525-539), Stüber et al. (P.N.A.S. USA, (1981), 78, 167-171), Unger et al. (Nucleic Acids Res. (1984), 12, 7693-7703) et Tovar et al. (Mol. Gen. Genet. (1988), 215, 76-80).

La séquence de régulation peut comprendre une unique séquence tet opérateur ou au contraire plusieurs séquences tet opérateur pouvant atteindre jusqu'au

nombre de 10 selon que l'on souhaite ou non augmenter la régulation de la transcription. Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la séquence de régulation met en oeuvre 2 séquences tet opérateur. Elle sera alors dite Op2.

5 Plus préférentiellement, la séquence de régulation est représentée en tout ou partie par l'une des séquences représentées en SEQ ID N° 3 ou N° 4 ou l'un de leurs dérivés.

Classiquement, cette séquence de régulation est liée opérationnellement en amont c'est-à-dire à l'extrémité 5' du promoteur minimal de manière à permettre la transcription du gène d'origine virale, en présence du complexe formé par l'activateur  
10 de transcription et de son ligand tétracycline. On a ainsi successivement, dans l'orientation 5' à 3', la séquence de régulation, liée directement ou non au promoteur minimal, le promoteur minimal et le gène d'origine virale. Toutefois, on peut également envisager de placer cette séquence de régulation, au sein du promoteur minimal, en aval de la séquence nucléotide virale à transcrire c'est-à-dire à son  
15 extrémité 3'. L'ordre de succession est alors dans le sens 5' à 3', promoteur minimal, gène viral et séquence de régulation.

Selon un mode préféré de l'invention, le promoteur inductible à la tétracycline associe au promoteur minimal de la thymidine kinase dit Tk, une séquence de régulation représentée par Op2. Il est dans ce cas particulier identifié  
20 ci-après sous la dénomination Op2/Tk. Plus préférentiellement, le promoteur inductible mis en oeuvre selon l'invention est représenté en tout ou partie par la SEQ ID N° 5 ou l'un de ses dérivés.

Ce promoteur inductible à la tétracycline Op2/Tk et plus particulièrement celui représenté en tout ou partie par la SEQ ID N° 5 ou l'un de ses dérivés,  
25 constituent également un des objets de la présente invention.

En conséquence, l'expression du ou des gènes viraux liés opérationnellement, dans l'adénovirus revendiqué, à un promoteur inductible, est

totalelement subordonnée à la fixation du complexe formé par l'activateur de transcription et la tétracycline, sur la séquence de régulation dudit promoteur.

Cette fixation n'est effective qu'en présence de tétracycline. En absence de tétracycline ou de tout analogue de celle-ci, il n'y a pas de liaison établie entre la  
5 séquence de régulation et l'activateur de transcription. Il s'en suit aucune transcription de la séquence virale liée au promoteur minimal. Qui plus est, avantageusement, l'agent induisant la transcription n'a pas à être présent continuellement.

Un des objets de la présente invention concerne plus particulièrement un adénovirus comprenant au moins un gène homologue c'est-à-dire adénoviral dont  
10 l'expression est contrôlée par un promoteur inductible et plus préférentiellement par un promoteur inductible à la tétracycline.

Ainsi, dans un mode particulier, la présente invention a pour objet un adénovirus recombinant dont au moins une région génomique essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale est placée en tout ou partie sous contrôle d'un  
15 promoteur inductible à la tétracycline. La région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale selon la présente invention est avantageusement choisie parmi tout ou partie de la région E4, E2, la région IVa2 et/ou la région L5, etc.

Selon un mode particulièrement avantageux, les adénovirus recombinants de la présente invention, comprennent à titre de séquences nécessaires à la réplication  
20 et/ou la propagation, tout ou une partie fonctionnelle des régions E2 ou E4. Plus particulièrement, s'agissant de la région E4, les gènes importants sont les gènes ORF3, ORF6 et ORF6/7.

La région E2 est impliquée dans la régulation de l'ADN viral. Cette région E2 est constituée de deux sous unités de transcription E2A et E2B.

25 La région E4 est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des mutants dépourvus de E4 sont incapables de se propager. E4 constitue ainsi une

région essentielle à la propagation virale. Cette région E4 est constituée de 7 phases  
ouvertes de lecture, désignées ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF3/4, ORF6 et ORF6/7  
(figure 2). Parmi celles-ci, ORF3 et ORF6 sont les deux gènes essentiels à la  
propagation virale. Chacun de ces gènes est capable d'induire la propagation virale,  
5 ORF6 y jouant toutefois un rôle plus important que ORF3 (Huang et Hearing (1988),  
J. Virol. 63, 2605).

Dans un mode particulier, dans les vecteurs de l'invention, la totalité de la  
région considérée est placée sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline.  
Dans le cas particulier de la région E2, il peut s'agir d'un fragment correspondant à  
10 l'ADNc de la 72K, à l'ADNc de la polymérase de 140K ou à l'ADNc de la protéine  
pré-terminale de 87K. En ce qui concerne la région E4, il peut s'agir en particulier du  
fragment Taq1-Bgl2 correspondant aux nucléotides 35576 -32490.

Dans un autre mode particulier, seule l'expression d'une partie fonctionnelle  
de ces régions c'est-à-dire suffisante pour permettre la propagation virale, est  
15 contrôlée. Dans le cas particulier de E4, cette partie comprend au moins un gène  
ORF3 ou ORF6 fonctionnel. Préférentiellement, la partie fonctionnelle de E4 est  
constituée essentiellement de ORF6. A titre d'exemple, le fragment Bgl2, compris  
entre les positions 34115 à 32490 et contenant les séquences des ORF6 et ORF7 de  
l'Ad5 peut être positionné en aval d'un promoteur inductible tel que défini selon  
20 l'invention.

Dans un autre mode particulier de la présente invention, la région essentielle  
est constituée de la région codant pour la protéine IVa2 et par exemple son ADNc.  
Dans un autre mode de réalisation, la région codant pour la protéine IVa2 est  
comprise dans un fragment BglII-NruI correspondant aux nucléotides 3328 à 6316 sur  
25 la séquence de l'adénovirus Ad5 sauvage, un fragment DraI-NlaIII correspondant aux  
nucléotides 4029 à 5719 ou un fragment draI à XhoI correspondant aux nucléotides  
4029 à 5788.

Selon un mode préféré de l'invention, les promoteurs des régions essentielles  
à la propagation virale sont remplacés au sein du génome viral par un promoteur  
30 inductible et plus préférentiellement par un promoteur inductible à la tétracycline.

Dans un premier mode particulier de réalisation, les adénovirus recombinants de l'invention portent une délétion de tout ou partie du gène E1 et possèdent la région E4, en tout ou partie, sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline, de préférence de type Op2/Tk.

- 5        Dans un autre mode particulier de réalisation, les adénovirus recombinants de l'invention portent une délétion de tout ou partie du gène E1 et possèdent la région E2 en tout ou partie sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline, de préférence de type Op2/Tk.

- 10       Toujours selon un mode préféré de réalisation, les adénovirus recombinants de l'invention portent une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E2 et possèdent la région E4 en tout ou partie sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline, de préférence de type Op2/Tk.

- 15       Dans une variante particulièrement avantageuse, les adénovirus recombinants de l'invention portent une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4 et possèdent la région E2 en tout ou partie sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline, de préférence de type Op2/Tk.

- 20       Avantagusement, les adénovirus recombinants de l'invention comportent en outre une séquence d'acides nucléiques hétérologue comportant un ou plusieurs gènes thérapeutiques dont le transfert et/ou l'expression dans une cellule, un organe ou un organisme est recherché.

Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tout gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

- 25       Il peut s'agir en particulier de gènes codant pour des produits protéiques ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une

protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule lui permettant de lutter contre une pathologie.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc), etc.

Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires comme les ribozymes. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308.

Le gène thérapeutique peut aussi être un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation de vaccins permettant d'immuniser l'homme, notamment contre des microorganismes ou des virus. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée, ainsi qu'une région située en 3' du gène d'intérêt, et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments

5 constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes

10 eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences

15 d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire. Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique hétérologue ne comporte pas de séquences promotrices, il peut être inséré dans le génome du virus déficient en aval d'une telle séquence.

Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également

20 comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

25 Cette séquence d'acides nucléiques est de préférence présente au niveau des régions E1, E3 ou E4, en supplément ou en remplacement de séquences délétées.

La présente invention a pour second objet principal un adénovirus comportant au moins un gène d'origine virale hétérologue dont l'expression est contrôlée par un promoteur inductible et plus préférentiellement un promoteur

30 inductible à la tétracycline.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention le gène d'origine virale hétérologue est ou dérive d'un gène du génome d'un AAV ou un de ses homologues fonctionnels.

Les AAV sont des virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent  
5 dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont également capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend 4680 bases, et contient à chaque extrémité  
10 une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.  
15 Trois promoteurs y ont été localisés et nommés selon leur position approximative en unités cartographiques p5, p19 et p40. Quatre protéines sont au moins synthétisées à partir de la région rep et ont été nommés d'après leur masse moléculaire apparente, Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Les 2 mRNA transcrits à partir du promoteur p5 sont utilisés pour la synthèse de Rep78 et Rep68. Quant à Rep52 et Rep40 ils sont  
20 synthétisés à partir des messagers provenant du promoteur p19. En ce qui concerne plus particulièrement le gène cap, il code pour les protéines de la capsid du virus (VP1, VP2 et VP3). VP3 est la protéine de capsid majoritaire et sa séquence en acides aminés est contenue dans celles de deux protéines plus grandes mais moins abondantes VP1 et VP2 ( faire un schéma). Ces gènes rep et cap ont été caractérisés et  
25 leur séquences respectives décrites dans la littérature (Srivastava et al., J. Virol. 45 (1983) 555).

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US 5,139,941, EP 488 528). Généralement, les constructions utilisées



en thérapie génique contiennent une délétion des gènes rep et/ou cap qui sont remplacés par un gène d'intérêt.

Pour se répliquer, les AAV ont besoin de la présence d'un virus auxiliaire ("helper") capable de transcomplémenter les fonctions nécessaires à leur réplication . Il  
5 peut s'agir en particulier d'un adénovirus, d'un virus de l'herpès ou d'un virus de la vaccine. (En l'absence d'un tel virus auxiliaire, les AAV restent sous forme latente dans le génome des cellules infectées, mais ne peuvent se répliquer et ainsi produire des particules virales.) Classiquement, les AAV recombinants sont donc produits par co-transfection, dans une lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par  
10 exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant le gène d'intérêt bordé de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV et d'un plasmide portant les gènes d'encapsulation (gènes rep et cap) d'AAV. La co-infection avec l'adénovirus démarre une cascade d'événements qui aboutissent à la production de titres élevés d'AAV et diminuent sensiblement la production d'adénovirus. Cette cascade démarre par la  
15 synthèse du produit du gène E1a qui induit la transcription à partir des promoteurs p5 et p19 et conduit à la synthèse d'une petite quantité de protéines Rep. Une ou plusieurs protéines Rep synthétisées à partir de p5 induisent alors la synthèse en quantité plus abondante d'ARNm à partir des 3 promoteurs à un niveau beaucoup plus important et d'une manière coordonnée. En absence d'adénovirus, le génome d'AAV est soit perdu  
20 soit intégré dans le chromosome de l'hôte. D'autres gènes que E1A de l'adénovirus sont aussi nécessaires pour une expression efficace des gènes de l'AAV.

Avantageusement, la demanderesse a mis en évidence qu'il était possible de placer efficacement au moins l'expression d'un des gènes viraux de l'AAV sous contrôle d'un promoteur inductible dans un adénovirus et plus préférentiellement de  
25 contrôler l'expression des fonctions d'encapsulation d'AAV en particulier l'expression des gènes rep et/ou cap, ou de tout gène homologue fonctionnel.

Un homologue fonctionnel correspond à tout gène obtenu par modification (mutation, suppression, addition, etc) des gènes rep ou cap et présentant une activité de même nature. De tels gènes homologues fonctionnels peuvent également être des

gènes obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques au moyen de sondes correspondant aux gènes rep ou cap. A titre de gène rep muté susceptible d'être contrôlé selon l'invention, on peut plus particulièrement citer son mutant in1177 décrit dans la publication Y. Yang et al., (1992) Journal of virology, 6058-6069) et dérivant d'une insertion de sérines entre les codons 286 et 287.

Selon un mode préféré de l'invention, le promoteur inductible mis en oeuvre est un promoteur inductible à la tétracycline tel que défini précédemment.

Un tel adénovirus est avantageux à plusieurs titres : il simplifie considérablement sur le plan des manipulations, le procédé pour préparer des stocks en AAV. En effet, dans ce cas particulier, on met essentiellement en oeuvre que ledit adénovirus comportant les gènes rep et cap sous contrôle du promoteur inductible, un AAV recombinant et une lignée cellulaire adéquate. Enfin, les titres attendus en AAV à partir d'un tel adénovirus s'avèrent supérieurs à ceux obtenus selon un procédé classique.

Le promoteur inductible peut notamment être introduit en substitution d'un des promoteurs conduisant normalement l'expression du ou des gène(s) considéré(s) et en particulier en substitution du promoteur p5, p19 ou p40. Le promoteur p5 semblant être le plus impliqué dans le démarrage de la cascade d'événements conduisant à la production du virus, on procède plus préférentiellement à sa substitution par un promoteur inductible par la tétracycline de préférence de type Op2/Tk. Avantageusement, une telle construction permet de verrouiller l'expression de rep et cap en absence de tétracycline.

Les fonctions d'encapsulation d'AAV sous contrôle du promoteur inductible, peuvent être introduites dans différentes régions du génome de l'adénovirus revendiqué. Avantageusement, les fonctions d'encapsulation sont insérées dans une région ne perturbant pas la capacité du virus à transcomplémenter les AAV. Il est également possible d'insérer les fonctions d'encapsulation dans une région fonctionnelle du génome dudit adénovirus, laquelle région étant alors apportée en trans, soit par un plasmide, soit par la lignée cellulaire utilisée. Il est possible par

exemple d'insérer le gène rep, le gène cap ou les gènes rep et cap au niveau des régions E1 ou E3 en remplacement ou supplément des séquences déletées.

- Pour abolir toute fuite transcriptionnelle due à la proximité de la région ITR-psi, on peut en outre introduire une séquence dite séquence de régulation négative.
- 5 Une telle séquence insérée notamment entre l'ITR gauche et la séquence psi de l'adénovirus revendiqué d'une part, et la séquence codant pour le promoteur inductible à la tétracycline permet d'endiguer toute activation transcriptionnelle parasitaire de rep et cap, induite le cas échéant par l'enhancer situé dans l'ITR gauche de l'adénovirus et la séquence psi. A titre de séquences négatives pouvant être mises
- 10 en oeuvre selon l'invention, on peut notamment citer celles identifiées dans le promoteur vimentine (Salveti et al., (1993), Mol. Cell. Biol., 1676-1685) dans le promoteur interféron (Whitemore et al. (1990), P.N.A.S., 87, 7799-7803), dans le gène de chaîne 2 légère de la myosine cardiaque (Ruoquian-Shen et al. (1991), Mol. Cell. Biol., 1676-1685) et dans le promoteur albumine de souris (Herbst et al.
- 15 (1990), Mol. Cell. Biol., 3896-3905).

Selon un mode de réalisation préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant portant une cassette d'expression Op2/Tk-rep-cap.

- La présente invention a également pour objet l'utilisation de ces adénovirus intégrant une séquence virale d'origine AAV sous contrôle d'un promoteur inductible à
- 20 la tétracycline pour préparer des AAV.

Dans un mode de réalisation préféré, les adénovirus objets de l'invention comprennent les séquences ITR et une séquence permettant l'encapsidation. Préférentiellement ces adénovirus possèdent en outre une région E1 non fonctionnelle.

- Les séquences inversées répétées (ITR) constituent l'origine de répllication des
- 25 adénovirus. Elles sont localisées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Cf figure 1), d'où elles peuvent être isolées aisément selon les techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. La séquence nucléotidique des séquences ITR des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et Ad5) est décrite dans

la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1 et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence ITR gauche correspond à la région comprenant les nucléotides 1 à 103 du génome.

La séquence d'encapsidation (également désignée séquence Psi) est nécessaire  
5 à l'encapsidation de l'ADN viral. Cette région doit donc être présente pour permettre la  
préparation d'adénovirus recombinants défectifs selon l'invention. La séquence  
d'encapsidation est localisée dans le génome des adénovirus, entre l'ITR gauche (5') et  
le gène E1 (Cf figure 1). Elle peut être isolée ou synthétisée artificiellement par les  
techniques classiques de biologie moléculaire. La séquence nucléotidique de la  
10 séquence d'encapsidation des adénovirus humains (en particulier des sérotypes Ad2 et  
Ad5) est décrite dans la littérature, ainsi que des adénovirus canins (notamment CAV1  
et CAV2). Concernant l'adénovirus Ad5 par exemple, la séquence d'encapsidation  
correspond à la région comprenant les nucléotides 194 à 358 du génome.

Selon un mode particulièrement avantageux, dans les adénovirus  
15 recombinants de la présente invention, la région E1 est inactivée par délétion d'un  
fragment PvuII-BglII allant du nucléotide 454 au nucléotide 3328, sur la séquence de  
l'adénovirus Ad5. Cette séquence est accessible dans la littérature et également sur  
base de données (voir notamment Genebank n° M73260). Dans un autre mode de  
réalisation préféré, la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment HinfII-Sau3A  
20 allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446.

Les adénovirus de l'invention peuvent être préparés à partir d'adénovirus  
d'origines diverses. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure  
et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique  
comparable. Ainsi, les enseignements décrits dans la présente demande peuvent être  
25 aisément reproduits par l'homme du métier pour tout type d'adénovirus.

Plus particulièrement, les adénovirus de l'invention peuvent être d'origine  
humaine, animale, ou mixte (humaine et animale).

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on préfère utiliser ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

5           Comme indiqué plus haut, les adénovirus de l'invention peuvent également être d'origine animale, ou comporter des séquences issues d'adénovirus d'origine animale. La demanderesse a en effet montré que les adénovirus d'origine animale sont capables d'infecter avec une grande efficacité les cellules humaines, et qu'ils sont incapables de se propager dans les cellules humaines dans lesquelles ils ont été testés  
10           (Cf demande WO 94/26914). La demanderesse a également montré que les adénovirus d'origine animale ne sont nullement trans-complémentés par des adénovirus d'origine humaine, ce qui élimine tout risque de recombinaison et de propagation in vivo, en présence d'un adénovirus humain, pouvant conduire à la formation d'une particule infectieuse. L'utilisation d'adénovirus ou de régions d'adénovirus d'origine animale est  
15           donc particulièrement avantageuse puisque les risques inhérents à l'utilisation de virus comme vecteurs en thérapie génique sont encore plus faibles.

          Les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV).  
20           Plus particulièrement, parmi les adénovirus aviaires, on peut citer les sérotypes 1 à 10 accessibles à l'ATCC, comme par exemple les souches Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou encore les souches référencées ATCC VR-831 à 835. Parmi les adénovirus bovins, on peut  
25           utiliser les différents sérotypes connus, et notamment ceux disponibles à l'ATCC (types 1 à 8) sous les références ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 et 769. On peut également citer les adénovirus murins FL (ATCC VR-550) et E20308 (ATCC VR-528), l'adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343), ou type 6 (ATCC VR-1340) ; l'adénovirus porcin 5359), ou les adénovirus simiens tels que notamment les

adénovirus référencée à l'ATCC sous les numéros VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De préférence, parmi les différents adénovirus d'origine animale, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus ou des régions d'adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Les adénovirus canins ont fait l'objet de nombreuses études structurales. Ainsi, des cartes de restriction complètes des adénovirus CAV1 et CAV2 ont été décrites dans l'art antérieur (Spibey et al., J. Gen. Virol. 70 (1989) 165), et les gènes E1a, E3 ainsi que les séquences ITR ont été clonés et séquencés (voir notamment Spibey et al., Virus Res. 14 (1989) 241 ; Linné, Virus Res. 23 (1992) 119, WO 91/11525).

La présente invention se rapporte en outre à un procédé utile pour la préparation d'AAV.

Plus précisément, elle a pour objet un procédé de préparation d'AAV caractérisé en ce qu'il comprend la co-transfection, en présence de tétracycline ou un de ses analogues, d'une lignée cellulaire comprenant dans son génome la cassette d'expression d'un activateur de transcription, avec un adénovirus comprenant au moins un gène d'origine AAV sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline et, soit un virus recombinant dérivé de l'AAV soit un plasmide portant un transgène entre les ITR de l'AAV. Il s'agit plus préférentiellement d'un adénovirus comprenant à titre de gènes viraux hétérologues les gènes rep et cap.

Le procédé selon l'invention met à profit la faculté d'induire l'expression de ces gènes rep et cap placés sous contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline au sein d'un adénovirus, en présence d'une quantité suffisante de la tétracycline et d'un activateur de transcription.

Comme explicité auparavant, ce procédé a pour avantage d'être simplifié sur le plan des manipulations par rapport à un procédé classique. Dans le cas présent, on ne met en oeuvre qu'une co-infection d'une lignée cellulaire par un adénovirus tel que revendiqué et un virus recombinant dérivé d'un AAV.

Outre l'adénovirus transformé selon l'invention, ce procédé met en oeuvre une lignée cellulaire comportant dans son génome une cassette d'expression de la protéine dite activateur de transcription constitué d'un premier polypeptide capable de se lier, en présence de tétracycline ou un de ses analogues, à la séquence de régulation du promoteur inductible présent dans l'adénovirus, associé à un second polypeptide qui active la transcription.

En ce qui concerne plus particulièrement la protéine dite activateur de transcription, elle se caractérise donc par son aptitude à se lier, en présence de tétracycline, à la séquence dite de régulation et sa capacité à activer du promoteur minimal qui lui est associé. Comme explicité précédemment, il s'agit d'une protéine constituée de deux polypeptides, un premier polypeptide qui se lie aux séquences tet opérateur, en présence de tétracycline ou d'un analogue de celle-ci, et un second polypeptide dont la fonction est plus spécifiquement d'activer ladite transcription.

Selon un mode privilégié de l'invention, le premier polypeptide de la protéine dite activateur transcriptionnel est un répresseur de la tétracycline muté de manière à manifester un comportement inverse à celui d'un répresseur sauvage c'est-à-dire qu'il ne se lie aux séquences tet opératrices qu'en présence et non en absence de tétracycline. Ce type de mutation peut être effectué selon des techniques biologiques classiques de type mutagénèses. La différence en acides aminés entre le répresseur sauvage et le répresseur muté conforme à la présente invention peut consister en une substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés. Elle a pour effet de conférer au répresseur ainsi transformé deux propriétés fonctionnelles: il peut se lier à la séquence de régulation figurée par des opérateurs tétracycline par analogie au répresseur sauvage ; en revanche il est régulé de manière inverse par la tétracycline.

De nombreuses classes de répresseurs sauvages de la tétracycline ont déjà été décrites dans la littérature parmi lesquelles on peut notamment citer les classes A, B, C, D et E. A titre représentatif de ces répresseurs, on peut plus particulièrement mentionner le répresseur dit Tn 10 qui appartient à la classe B. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention le répresseur mis en oeuvre dérive de ce répresseur

sauvage Tn10. Plus précisément, il s'agit d'un répresseur Tn10 muté en au moins un acide aminé localisé en position 71, 95, 101 ou 102.

Plus préférentiellement, il possède en tout ou partie, la séquence d'acides aminés représentée en SEQ ID N° 8. Il sera dit TetR.

5        En ce qui concerne le second polypeptide présent dans la protéine dite activateur de transcription, il peut s'agir de n'importe quel domaine d'activation transcriptionnel déjà connu. Selon un mode réalisation préféré de l'invention, il s'agit du domaine d'activation de la protéine 16 du virus herpès simplex, plus particulièrement des 130 acides aminés de l'extrémité C terminale de VP16 et plus  
10        préférentiellement des 11 acides aminés de cette extrémité C terminale de VP16 ou encore de portions peptidiques de la partie C terminale de VP16 (Sceipel K. et al EMBO J. 1992 ; 13, 4961-4968) ou de dérivés.

      Dans le cas du procédé de production d'AAV revendiqué, la cassette d'expression de cet activateur de transcription est de préférence intégrée dans le  
15        génome d'une lignée cellulaire 293.

      Selon un mode préféré de l'invention, l'expression de cet activateur de transcription est également placée, dans la lignée cellulaire, sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline ou un de ses analogues tel que défini précédemment. Plus préférentiellement, il s'agit d'une lignée cellulaire 293 intégrant  
20        dans son génome la cassette Op2/Tk- TetR-VP16.

      La présente invention a également pour objet une lignée cellulaire comportant dans son génome une cassette d'expression d'un activateur de transcription tel que défini précédemment comprenant ou non un promoteur inductible comme défini selon l'invention. Plus préférentiellement, il s'agit d'une lignée cellulaire intégrant dans son  
25        génome la cassette Op2/Tk- TetR-VP16.

      L'invention se rapporte également à l'utilisation de ce type de lignée cellulaire pour produire des adénovirus selon l'invention ou des AAVs.



La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'adénovirus comportant au moins un de leurs gènes dont l'expression est sous contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés  
5 de différentes façons.

Une première méthode consiste à transfecter l'ADN du virus recombinant défectif préparé in vitro (soit par ligature, soit sous forme de plasmide) dans une lignée cellulaire compétente, c'est-à-dire portant en trans toutes les fonctions nécessaires à la complémentation du virus, et un activateur de transcription. Ces fonctions sont  
10 préférentiellement intégrées dans le génome de la cellule, ce qui permet d'éviter les risques de recombinaison, et confère une stabilité accrue à la lignée cellulaire.

Ensuite, les vecteurs qui se sont multipliés en présence d'une quantité suffisante en tétracycline ou l'un de ses analogues, sont récupérés, purifiés et amplifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

15 Selon une variante de mise en oeuvre, il est possible de préparer in vitro, soit par ligature, soit sous forme de plasmide, l'ADN du virus recombinant défectif portant les délétions appropriées, un ou plusieurs gènes viraux sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline et un ou des gènes thérapeutiques. Les suppressions sont généralement réalisées sur l'ADN du virus recombinant défectif,  
20 par mise en oeuvre de digestions au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligatures, selon les techniques de biologie moléculaire, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les gènes viraux ou thérapeutiques et le promoteur inductible peuvent ensuite être insérés dans cet ADN par clivage enzymatique puis ligature, au niveau des régions sélectionnées et dans l'orientation choisie. L'ADN ainsi obtenu, qui porte  
25 donc les délétions appropriées, un ou plusieurs gènes viraux sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline et un ou des gènes thérapeutiques permet de générer directement l'adénovirus recombinant revendiqué.

Il est également possible de préparer le virus recombinant en étapes successives, permettant l'introduction successive des gènes hétérologues et du

promoteur inductible. Ainsi, l'ADN d'un premier virus recombinant portant les délétions appropriées (ou une partie desdites délétions) et un promoteur inductible comme par exemple Op2/Tk est construit, par ligature ou sous forme de plasmide. Cet ADN est ensuite utilisé pour générer un premier virus recombinant portant lesdites  
5 délétions avec un promoteur inductible. L'ADN de ce premier virus est ensuite isolé et co-transfecté avec un second plasmide ou l'ADN d'un second virus recombinant défectif portant les délétions appropriées notamment une délétion dans la région E1, une région permettant la recombinaison homologue et le cas échéant, un gène thérapeutique. Cette deuxième étape génère ainsi le virus recombinant selon  
10 l'invention.

La présente invention concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants tels que décrits précédemment. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse,  
15 intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles,  
20 isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement  
25 recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture

cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 5 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Les adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la  
5 prévention de nombreuses pathologies. Ils sont particulièrement avantageux pour le traitement des pathologies hyperprolifératives (cancers, resténose, etc), par injection directe au niveau du site concerné. A cet égard, la présente invention concerne également une méthode pour la destruction de cellules prolifératives comprenant l'infection desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec un vecteur adénoviral tel  
10 que défini ci-dessus. Dans le cas où le gène suicide est un gène conférant une sensibilité à un agent thérapeutique, la méthode de destruction selon l'invention comprend ensuite le traitement des cellules par ledit agent thérapeutique. Pour la mise en oeuvre de cette méthode, l'invention a également pour objet les produits comprenant un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant dans lequel le gène  
15 suicide est un gène conférant une sensibilité à un agent thérapeutique; et ledit agent thérapeutique, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des pathologies hyperprolifératives. Plus particulièrement, le gène suicide est un gène thymidine kinase et l'agent thérapeutique est le gancyclovir ou l'acyclovir ou un analogue.

20 Des vecteurs recombinants selon l'invention possèdent des propriétés particulièrement attractives pour une utilisation en thérapie génique. Ces vecteurs combinent en effet des propriétés d'infection, de sécurité et de capacité de transfert de gènes très élevées.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et  
25 figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Figure 1 : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

Figure 2 : Organisation génétique de la région E4.

Figure 3: Organisation génétique de l'AAV.

### **Techniques générales de biologie moléculaire**

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982 ; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les  
5 spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

### Lignées cellulaires utilisées

10 Dans les exemples qui suivent, les lignées cellulaires suivantes ont ou peuvent être utilisées :

- Lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %).

15 - Lignée de cellules humaines KB : Issue d'un carcinome épidermique humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant sa culture.

- Lignée de cellules humaines Hela : Issue d'un carcinome de l'épithélium humain, cette lignée est accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions  
20 permettant sa culture.

- Lignée de cellules canines MDCK : Les conditions de culture des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.

- Lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624). Cette lignée est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le  
25 contrôle du LTR de MMTV.

### EXEMPLE 1

#### Construction d'un adénovirus portant son domaine E4 sous contrôle d'un promoteur Op2-Tk.

### 1- Construction du plasmide pIC20H/Op2-Tk:

Ce plasmide porte la séquence du promoteur minimum Tk précédé par deux séquences de l'opérateur tétracycline, ces séquences sont reconnues par le répresseur tétracycline lorsqu'il est fixé à la tétracycline.

- 5 Pour l'obtenir, le plasmide pIC20H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481) est digéré par ClaI-BamHI et la séquence SEQ ID N° 5, comprenant deux opérateurs tétracycline en amont d'un promoteur minimum thymidine kinase, est introduite entre ces deux sites.

### 2- Construction du plasmide pIC20H/ITR-Op2Tk

- 10 Ce plasmide est obtenu par digestion ClaI du plasmide pIC20H/Op2Tk et insertion d'un fragment Hpa2 contenant l'ITR de l'Ad5 (coordonnées: 1/+122). Ce fragment provient du vecteur commercial pSL1180 (Pharmacia) digéré par Hind3, site dans lequel est introduit l'ITR fabriqué par PCR. avec des sites Hind3 de chaque coté du fragment amplifié. On obtient dans l'ordre suivant: ITR-Op2-TKprom.

### 3- Construction du plasmide pIC20H/ITR-Op2Tk-E4

- 15 Ce plasmide correspond au plasmide pIC20H/ITR-Op2Tk digéré par Hind3, site dans lequel est inséré le fragment Nhe-Xba1 de PY6 contenant la région E4 de l'Ad5. En ce qui concerne le plasmide pPY6, il est obtenu selon le protocole suivant :

- 20 On prépare un plasmide pPY2 à partir du plasmide pIC20H. Ce plasmide pPY2 correspond au clonage du fragment Avr2-Sal1 (environ 1.3 kb incluant le promoteur du MMTV) du plasmide pMSG (Pharmacia) entre les sites Xba1 et Sal1 du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte E. coli dam+. Le plasmide pPY4 dérive du plasmide pPY2 par délétion d'un fragment de 35 pb après coupure par BamHI et Bgl2 puis religature. Le plasmide pPY5 correspond au plasmide pIC20H dans lequel le fragment Taq1-Bgl2 incluant la région E4 de l'adénovirus de type 5 située entre les  
25 positions 35576 (Taq1) et 32490 (Bgl2), a été cloné entre les sites ClaI et BamHI. La région E4 du plasmide pPY5 est donc incluse dans un fragment EcoRV-Sph1 que

l'on clone après digestion partielle entre les sites Sma1 et Sph1 du plasmide pPY4, ce qui génère le plasmide pPY6.

#### 4- Construction du plasmide pIC20H/TTR-Op2Tk-E4-L5

- Il est obtenu par digestion du plasmide pIC20H/TTR-Op2Tk-E4 par Kpn1 et Xba1 et  
5 insertion du fragment Kpn1-Xba1 de 3,1Kb de l'Ad5 (coordonnées : 33595-30470) contenant toute la région L5.

#### 5- Construction du plasmide pYG4-EP

- On digère le plasmide pIC20H/TTR-Op2Tk-E4-L5 par Xba1 et Nru1 pour récupérer le fragment correspondant qui porte dans l'ordre l'IIR, Op2, le promoteur Tk, E4 et L5.  
10 Ce fragment est inséré dans les sites Xba1 et Nru1 du plasmide pYG4 qui contient toute la séquence de l'adénovirus depuis le site Xba1 jusqu'au site Sph1. Ce plasmide pYG4-EP est un vecteur pIC20H dans lequel le fragment Sph1-Xba1 de l'Ad5 (coordonnées: 25095-28590) est inséré entre ses sites Sph1 et Xba1.  
15 Ce vecteur pYG4-EP, délété de la région adénovirale E3 possède suffisamment de séquences adénovirales entre les sites Sph1 et Xba1 pour permettre la recombinaison complémentaire de l'adénovirus pour la production d'un adénovirus recombinant.

#### 6- Construction de l'adénovirus recombinant

- Elle est réalisée par cotransfection de cellules 293/TetR-VP16, préparées selon l'exemple 3 ci-dessous, avec le plasmide pYG4 linéarisé par digestion Sph1 et avec  
20 l'adénovirus RSV-βgal ou un adénovirus portant un transgène, linéarisé par digestion Srf1 en présence ou non de tétracycline. On procède ensuite selon les techniques de virologie classiques pour la sélection et l'amplification de l'adénovirus recombinant.

#### EXEMPLE 2

- Construction de l'adénovirus recombinant portant les gènes rep-cap de l'AAV  
25 sous contrôle du promoteur Op2/Tk:

1- Construction du plasmide intermédiaire pXL2630:

Ce plasmide intermédiaire permet d'introduire un site EcoRI en aval de Op2-Tk. La présence d'un site de restriction en cette position présente deux intérêts. Il sert à introduire ce promoteur en amont de rep-cap après avoir supprimé le promoteur p5 et

5 il permet également d'insérer ce promoteur hybride en amont de TetR-VP16 pour la préparation d'une lignée cellulaire 293 transformée comme décrit en exemple 3 ci-après.

Pour ce faire, le plasmide pIC20H/Op2-Tk, obtenu selon le protocole décrit en exemple 1, est digéré par BamHI, traité par l'ADN polymérase de T4 pour rendre les

10 extrémités franches puis redigéré par EcoRV, le fragment provenant de cette digestion et portant le promoteur Op2-Tk est introduit au site EcoRV du plasmide commercial pBSSK+. L'orientation du fragment est sélectionnée pour la présence d'un site EcoRI en aval du promoteur.

3- Introduction d'un site EcoRI au niveau du +1 transcriptionnel de p5:

15 Pour supprimer le promoteur p5, on introduit un site EcoRI au niveau du +1 transcriptionnel du promoteur p5 en amont de la séquence codante de Rep78 par la technique de PCR sur le plasmide pAV2 ( Laughlin C., Gene (1983), 23, 69-73). Cette réaction a été réalisée à l'aide des oligonucléotides:

SEQ ID N°6( seq5269): 5' GAATTCTTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCG 3'

20

EcoRI

SEQ ID N°7( seq5039): 5' CTCCATGTACCTGGCTGA 3'

Le fragment ainsi généré a été introduit dans pCRII (Invitrogen) pour donner le plasmide pMA4. La séquence nucléotidique de ce fragment a été vérifiée.



4- Construction du plasmide pMA6 portant la jonction Op2-Tk-rep-cap:

- Ce plasmide intermédiaire permet de faire la jonction du promoteur inductible avec rep. Les fragments Sall-EcoRI de pXL2630 et EcoRI-NruI de pMA4 sont introduits aux sites XhoI (compatible avec Sall) et NruI de pIC20R (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481) pour donner le plasmide pMA6.

5- Construction du plasmide pC01 (figure 7 EX94008) qui contient la partie gauche de l'adénovirus Ad5 jusqu'au site HinfI (382), un multisite de clonage et le fragment Sau3A (3446) - NruI (6316) de l'adénovirus Ad5.

5-a / Construction du plasmide pCE

- 10 Le fragment EcoRI-XbaI correspondant à l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a d'abord été cloné entre les sites EcoRI et XbaI du vecteur pIC19H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481). Ceci génère le plasmide pCA. Le plasmide pCA a ensuite été coupé par HinfI, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été coupé par EcoRI.
- 15 Le fragment ainsi généré du plasmide pCA qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites EcoRI et SmaI du vecteur pIC20H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481). Ceci génère le plasmide pCB. Le plasmide pCB a ensuite été coupé par EcoRI, ses extrémités 5' proéminentes ont été remplies par le fragment de klenow de l'ADN polymérase I de E.coli, puis il a été
- 20 coupé par BamHI. Le fragment ainsi généré du plasmide pCB qui contient l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus Ad5 a ensuite été cloné entre les sites NruI et BglII du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCE dont une caractéristique intéressante est qu'il possède les 382 premières paires de bases de l'adénovirus Ad5 suivies d'un multisite de clonage.
- 25 5-b/ - Construction du plasmide pCD'
- Le fragment Sau3A (3346) - SstI (3645) et le fragment SstI (3645) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 ont tout d'abord été ligaturés et clonés entre les sites ClaI et BamHI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY53. Le fragment Sall-

TaqI du plasmide pPY53 préparé à partir d'un contexte dam-, contenant la partie du génome de l'adénovirus Ad5 comprise entre les sites Sau3A (3346) et TaqI (5207) a ensuite été cloné entre les sites SalI et ClaI du vecteur pIC20H, ce qui génère le plasmide pCA'. Le fragment TaqI (5207) - NarI (5519) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment SalI-TaqI du plasmide pCA' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites SalI et NarI du vecteur pIC20H. Ceci génère le plasmide pCC'. Le fragment NarI (5519) - NruI (6316) du génome de l'adénovirus Ad5 préparé à partir d'un contexte dam- et le fragment SalI-NarI du plasmide pCC' ont ensuite été ligaturés et clonés entre les sites SalI et NruI du vecteur pIC20R. Ceci génère le plasmide pCD'.

#### 5-c/ - Construction du plasmide pC01

Une digestion partielle par XhoI puis une digestion complète par SalI du plasmide pCD' génère un fragment de restriction qui contient la séquence de l'adénovirus Ad5, du site Sau3A (3446) au site NruI (6316). Ce fragment a été cloné dans le site SalI du plasmide pCE. Ceci génère le plasmide pC01.

#### 6- Construction des plasmides pMA7 et pMA8.

Le fragment EcoRV-SnaBI de pMA6 portant Op2-Tk-rep-cap-polyA+de l'AAV (jusqu'au site SnaBI position 4495 sur la séquence de l'AAV) est introduit au site EcoRV de pC01 dans les deux orientations par rapport à l'ITR de l'adénovirus. Les plasmides ainsi obtenus sont désignés pMA7 (orientation de la cassette en sens inverse de l'ITR de l'adénovirus) et pMA8 (même orientation).

#### 7- Construction de l'adénovirus recombinant portant Op2-Tk-rep-cap:

Cette partie décrit la construction d'un adénovirus recombinant déficient portant la cassette Op2-Tk-rep-cap-polyA+de l'AAV. Cet adénovirus est obtenu par co-transfection du plasmide pMA7 ou pMA8 avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément les adénovirus AdMA7 et AdMA8 ont été préparés par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus AdRSV $\beta$ gal et les plasmides pMA7 et pMA8 selon le protocole suivant: le plasmide pMA7 ou pMA8 linéarisé par NdeI et l'adénovirus AdRSVBgal linéarisé par ClaI sont cotransfectés dans la lignée 5 293 en présence de phosphate de calcium pour permettre la recombinaison. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10<sup>10</sup> pfu/ml. Pour la purification, les particules virales 10 sont centrifugées sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973)456).

L'adénovirus AdMA7 ou AdMA8 est conservé à -80°C dans 20 % glycérol.

8 Construction de l'adénovirus recombinant portant Op2 / Tk rep-cap polyA+AAV dans la région E3:

15 Cette partie décrit la construction d'un adénovirus recombinant délété pour E1 portant Op2:Tk repcap polyA + AAV dans la région E3.

Le plasmide pMA28 contient toute la séquence de l'Ad(E1-, E3-) portant Op2:Tk repcap polyA + AAV dans la région E3. Il a été construit par recombinaison dans E. Coli en introduisant le plasmide pMA24 par exemple dans la souche C2110 20 (pXL2638) (E1-, E3-) décrite dans la demande PCT/FR96/00215 incluse ici par référence.

8.1 Construction du plasmide intermédiaire pMA22 :

Le fragment XbaI- XbaI du plsmide pMA7 portant Op2:Tk repcap polyA + AAV a été introduit au site XbaI de pYG4-EP a la place de la région E3 de telle sorte que 25 Op2:Tk repcap polyA + AAV soit dans l'orientation inverse de celle de la région E3. Le plasmide ainsi construit est pMA22.

8.2 Construction du plasmide pMA24 utilisé pour effectuer la recombinaison dans E.coli :

- le fragment NheI-SpeI de pMA22 contenant la cassette Op2:Tk repcap polyA + AAV flanquée des séquences de 27082 à 28593 et de 3471 à 31509 de l'Adénovirus a été
- 5 introduite au site compatible du plasmide pXL2756 pour générer le plasmide pMA24 portant les régions nécessaires à la recombinaison encadrant la cassette Op2:Tk repcap polyA + AAV, le gène sacB de B. subtilis et le gène de résistance à la kanamycine.

8.3 Construction de l'adénovirus recombinant portant Op2:Tk repcap polyA + AAV dans la région E3 :

- 10 Elle a été faite par recombinaison dans E. coli en electroporant le plasmide pMA24 dans la souche C2110 (pXL2688) ou c2110 (pXL2789) en sélectionnant un deuxième événement de recombinaison sur milieu LB, sucrose, tétracycline. On obtient ainsi une souche C2110 portant le plasmide pMA28.

Ce plasmide a ensuite été transfecté dans les cellules 293 après digestion par PacI

15 EXEMPLE 3

Construction de la lignée productrice 293 Op2-Tk-TetR-VP16:

- Cette partie décrit la construction d'une lignée 293 portant intégrée dans son génome la cassette du transactivateur hybride TetR-VP16 sous le contrôle du promoteur Op2-Tk. A cette fin, le plasmide pMA2 a été construit pour établir une lignée par
- 20 cotransfection de ce plasmide pMA2 avec un plasmide pMSCV (Hawley et al. J.Exp.Med. (1993), vol176, 1149-1163) portant le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur PGK (phosphoglyceratekinase). pMA2 est construit en insérant le fragment SalI-EcoRI de pXL2630 entre les sites compatibles XhoI-EcoRI d'un plasmide pUHD17.1. Le plasmide pUHD17.1 est un plasmide comprenant les
- 25 séquences codant pour un répresseur de la tétracycline muté lié opérationnellement à la séquence VP16. Ce vecteur dérive du vecteur pUHD15.1( H. Bujard ; P.N.A.S. U.S.A. 1992, 89, 55476-5551) qui comprend la séquence du répresseur tétracycline

sauvage associée aux 130 acides aminés de l'extrémité C-terminale du virus de l'herpes simplex VP16. Un fragment XbaI-Eco47III de 399 paires de bases correspondant aux acides aminés 3 à 135 du répresseur de la tétracycline muté est échangé contre le fragment de restriction correspondant de pUHD15.1 pour conduire à pUHD17.1.

- 5 La lignée 293 Op2-Tk-TetR-VP16 de l'invention a été construite par co-transfection des cellules choisies en présence de phosphate de calcium, par les plasmides pMA2 et pMSCV et une construction codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes (Hollenberg et al., 1985). Plus précisément, les cellules de la lignée 293 en boîtes de 5cm de diamètre ont été transfectées par 1 à 5 µg de plasmide pMA2.

10 Sélection des clones résistants à la généticine

- Après transfection des cellules, celles ci sont lavées, puis le milieu de culture (MEM, Sigma) supplémenté en sérum de veau foetal (7 % final) est ajouté et les cellules sont mises à incuber pendant 20 heures. Le lendemain, on sélectionne les cellules en présence de généticine G418 (Gibco-BRL, Life Technologies) à la
- 15 concentration effective de 400 mg/l. La généticine est changée tous les trois jours et les clones sélectionnables apparaissent après environ 3 semaines. Quand toutes les cellules non transfectées sont mortes, seules les cellules ayant inséré le gène de résistance subsistent et se divisent pour générer des clones cellulaires. Quand les clones cellulaires sont suffisamment gros pour être visibles à l'oeil nu, ils sont
- 20 individuellement transférés dans les puits de culture d'une plaque de culture "24 trous". Chaque clone est ensuite progressivement amplifié en présence de généticine d'abord dans les puits d'une plaque de culture "12 trous", puis "6 trous" pour être ensuite amplifié en boîtes de culture cellulaires. Chaque clone cellulaire est alors conservé par congélation dans l'azote liquide.

- 25 Un certain nombre de clones ont été isolés, amplifiés et sélectionnés pour leur capacité à exprimer un gène reporter par exemple lacZ sous contrôle du promoteur Op2-Tk après addition d'une concentration appropriée de tétracycline. Le plasmide utilisé est pMA9 et a été construit par introduction d'un fragment StuI-BamHI de pRSVgalIX portant la séquence codant pour la  $\beta$ -galactosidase d'E.coli et un signal de

localisation nucléaire dans le plasmide pMA2 préalablement linéarisé par EcoRI; traité à l'ADN polymérase du bactériophage T4 pour rendre ses extrémités franches puis redigéré par BamHI.

- 5 Parmi ces clones, ceux permettant une expression conditionnelle de rep-cap porté par l'adénovirus décrit précédemment et permettant la production d'AAV à des titres élevés ont été utilisés comme lignée productrice.

## LISTE DE SEQUENCES

- 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:
- (i) DEPOSANT:
- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.  
(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron  
(C) VILLE: ANTONY  
10 (E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 92165  
(G) TELEPHONE: 40.91.69.22  
(H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96
- 15 (ii) TITRE DE L' INVENTION:  
UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8
- 20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- 30 (A) LONGUEUR: 61 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- 40 GATCCGGTCG CTCGGTGTTC GAGGCCACGC GTCACCTTAA TATCGGAAGT GGACCTCGGA 60  
C 61
- (3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:
- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 64 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
50 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- 55 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AGATCTGCGG TCCGAGGTCC ACTTCGCATA TTAAGGTGAC CGTGGCCTCG ACACCGAGCG 60  
ACCG 64

5 (4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
    (A) LONGUEUR: 67 paires de bases  
    (B) TYPE: nucléotide  
10     (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
    (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CGATACTTTT CTCTATCACT GATAGGGAGT GGTCTCGAGA CTTTCTCTA CACTGATAGG 60  
GAGTGGT 67

20

(5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
25     (A) LONGUEUR: 75 paires de bases  
    (B) TYPE: nucléotide  
    (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
    (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

35 CGCAGATCTA CCACTCCCTA TCACTGATAG AGAAAAGTCT CGAGACCACT CCCTATCAGT 60  
GATAGAGAAA AGTAT 75

40 (6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
    (A) LONGUEUR: 141 paires de bases  
    (B) TYPE: nucléotide  
45     (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
    (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

50



(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ATCGATACTT TTCTCTATCA CTGATAGGGA GTGGTCTCGA GACTTTTCTC TATCACTGAT 60  
AGGGAGTG GT AGATCTGCGG TCCGAGGTCC ACTTCGCATA TTAAGGTGAC GCGTGGCCTC 120  
5 GAACACCGAG CGACCGGATC C 141

10 (7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
15 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GAATTCTTTT GAAGCGGGAG GTTTGAACGC G 31

25

(8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 18 paires de bases  
30 (B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CTCCATGTAC CTGGCTGA 18

40

(9) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 206 acides aminés  
45 (B) TYPE: acides aminés  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

10 Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu  
 1 5 10 15  
 20 Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln  
 20 25 30  
 35 Leu Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys  
 15 35 40 45  
 50 Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His Thr  
 50 55 60  
 65 His Phe Cys Pro Leu Lys Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg Asn  
 65 70 75 80  
 85 Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Ala  
 85 90 95  
 100 Lys Val His Ser Glu Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr Leu  
 100 105 110  
 115 Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu Asn  
 115 120 125  
 130 Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys Val  
 130 135 140  
 145 Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr Pro  
 145 150 155 160  
 165 Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu Phe  
 165 170 175  
 180 Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu Ile  
 180 185 190  
 195 Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser  
 195 200 205

### REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant dans lequel l'expression d'au moins un gène d'origine virale, homologue ou hétérologue, est placée sous contrôle d'un promoteur inductible.
- 5           2. Adénovirus recombinant selon la revendication 1 caractérisé en ce que le promoteur inductible est choisi parmi les promoteurs répondant à des métaux lourds, à des chocs thermiques, à des hormones ou à la tétracycline.
3. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un promoteur inductible par la tétracycline ou un de ses analogues.
- 10           4. Adénovirus selon la revendication 3 caractérisé en ce que le promoteur inductible par la tétracycline comprend un promoteur minimal associé opérationnellement à une séquence de régulation comprenant au moins un opérateur de la tétracycline.
5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la séquence  
15 de régulation comprend au moins deux opérateurs de la tétracycline.
6. Adénovirus selon la revendication 4 ou 5 caractérisé en ce que la séquence de régulation est représentée en tout ou partie par la SEQ ID N° 3, la SEQ ID N° 4 ou l'un de leurs dérivés.
7. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisé  
20 en ce que le promoteur minimal dérive du CMV humain.
8. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 4 à 7 caractérisé en ce que le promoteur minimal correspond à la région comprise entre les nucléotides +75 à -53 ou +75 à -31 du promoteur CMV humain.
9. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisé  
25 en ce que le promoteur est un promoteur, homologue ou hétérologue du gène viral,

muté de manière à être incapable d'assurer seul la transcription du gène d'origine viral qu'il contrôle.

10. Adénovirus selon la revendication 9 caractérisé en ce que le promoteur minimal dérive d'un promoteur homologue du gène viral considéré.

5 11. Adénovirus selon la revendication 9 caractérisé en ce que le promoteur minimal dérive du promoteur de la thymidine kinase du Virus Herpès Simplex.

12. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce que le promoteur minimal est représenté en tout ou partie par la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2 ou l'un de leurs dérivés.

10 13. Adénovirus selon l'une des revendications 4 à 12 caractérisé en ce que le promoteur minimal est placé en amont du gène viral à transcrire, en substitution ou non de son propre promoteur.

14. Adénovirus selon l'une des revendications 4 à 13 caractérisé en ce qu'il comprend outre ledit promoteur minimal, le propre promoteur du gène viral considéré  
15 mais sous une forme inactivée ou non fonctionnelle.

15. Adénovirus selon l'une des revendications 4 à 14 caractérisé en ce que la séquence de régulation est placée en amont du promoteur minimal.

16. Adénovirus selon l'une des revendications 4 à 14 caractérisé en ce que la séquence de régulation est placée en aval du gène viral considéré.

20 17. Adénovirus selon la revendication 16 caractérisé en ce que la séquence de régulation est directement liée ou non au gène viral considéré.

18. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que le promoteur inductible est représenté par Op<sub>2</sub>/Tk.

19. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 6 ou 9 à 18 caractérisé en ce que le promoteur inductible est représenté en tout ou partie par la SEQ ID N° 5 ou l'un de ses dérivés.
20. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications précédentes  
5 comprenant au moins un gène homologue dont l'expression est placée sous contrôle d'un promoteur inductible.
21. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications précédentes comprenant au moins un gène homologue dont l'expression est placée sous contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline ou un de ses analogues.
- 10 22. Adénovirus recombinant selon la revendication 20 ou 21 caractérisé en ce qu'il s'agit de tout ou partie d'une région génomique dudit adénovirus, essentielle à sa réplication et/ou sa propagation.
23. Adénovirus recombinant selon la revendication 22 caractérisé en ce que la région essentielle à sa réplication et/ou sa propagation est choisie parmi tout ou  
15 partie de la région E4, E2 la région IVa2 et/ou la région L5.
24. Adénovirus recombinant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la région E2 est représentée par un fragment choisi parmi les fragments correspondant à l'ADNc de la 72K, l'ADNc de la polymérase de 140K et l'ADNc de la protéine pré-terminale de 87K.
- 20 25. Adénovirus recombinant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la région E4 est représentée par le fragment Taq1-Bgl2 correspondant aux nucléotides 35576-32490.
26. Adénovirus recombinant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la région E4 est représentée par au moins la phase codante ORF6.

27. Adénovirus recombinant selon la revendication 23 ou 25 caractérisé en ce que la région E4 est représentée par le fragment Bgl2 compris entre les positions 34115 à 32490 contenant les séquences de ORF6 et ORF7.

5 28. Adénovirus recombinant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la région codant pour IVa2 est constituée d'un fragment choisi parmi les fragments BglII-NruI comprenant les nucléotides 3328 à 6316, DraI- NlaIII correspondant aux nucléotides 4029 à 5719 et DraI-XhoI correspondant au fragment 4029 à 5788, sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

10 29. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 23 et 25 à 27 caractérisé en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie du gène E1 et possède la région E4, en tout ou partie, sous contrôle d'un promoteur inductible Op<sub>2</sub>/Tk.

30. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 24 caractérisé en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie du gène E1 et possède la région E2, en tout ou partie, sous contrôle d'un promoteur inductible Op<sub>2</sub>/Tk.

15 31. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 27 et 29 caractérisé en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E2 et possède la région E4, en tout ou partie, sous contrôle d'un promoteur inductible Op<sub>2</sub>/Tk.

20 32. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 27 et 30 caractérisé en ce qu'il porte une délétion de tout ou partie des gènes E1 et E4 et possède la région E2, en tout ou partie, sous contrôle d'un promoteur inductible Op<sub>2</sub>/Tk.

25 33. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 20 à 32 caractérisé en ce que la région placée sous contrôle d'un promoteur Op<sub>2</sub>/Tk est dépourvue de son propre promoteur.

34. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 20 à 33 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une séquence d'acides nucléiques codant pour un ou plusieurs gènes thérapeutiques.
35. Adénovirus recombinant selon la revendication 34 caractérisé en ce que  
5 ladite séquence d'acides nucléiques est présente au niveau des régions E1, E3 ou E4, en supplément ou en remplacement de séquences déléetées.
36. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 19 comprenant au moins un gène hétérologue d'origine virale dont l'expression est placée sous contrôle d'un promoteur inductible.
- 10 37. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 19 et 36 comprenant au moins un gène hétérologue d'origine virale dont l'expression est placée sous contrôle d'un promoteur inductible par la tétracycline ou un de ses analogues.
38. Adénovirus recombinant selon la revendication 36 ou 37 caractérisé en ce que le gène est ou dérive d'un gène du génome d'un virus adéno-associés (AAV) ou  
15 un de ses homologues fonctionnels.
39. Adénovirus recombinant selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène représentant les fonctions d'encapsidation d'un virus adéno-associés (AAV).
40. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 36 à 39  
20 caractérisé en ce qu'il comprend l'expression des gènes rep et/ou cap d'AAV ou un de leurs homologues sous contrôle d'un promoteur inductible.
41. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 36 à 40 caractérisé en ce qu'il porte une cassette d'expression Op2/Tk-rep-cap.
42. Adénovirus recombinant selon la revendication 41 caractérisé en ce que  
25 le promoteur Op2/Tk remplace le promoteur p5 d'origine.

43. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications 36 à 42 caractérisé en ce que le gène hétérologue d'origine virale et le promoteur inductible sont présents au niveau des région E1 du génome dudit adénovirus, en supplément ou en remplacement de séquences délétées.

5           44. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend ses ITR et une séquence permettant l'encapsidation.

45. Adénovirus recombinant selon l'une des revendications précédentes dans lequel au moins la région E1 est non fonctionnelle.

10           46. Adénovirus recombinant selon l'une des revendication précédentes caractérisé en ce que le génome d'adénovirus est d'origine humaine, animale, ou mixte.

47. Adénovirus recombinant selon la revendication 46 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine humaine sont choisis parmi ceux classés dans le groupe C, de préférence parmi les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

15           48. Adénovirus recombinant selon la revendication 47 caractérisé en ce que les adénovirus d'origine animale sont choisis parmi les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, ovine, porcine, aviaire et simienne.

49. Utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant au moins un gène d'origine AAV sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline pour la préparation d'AAV.

20           50. Procédé de préparation d'AAV caractérisé en ce qu'il comprend la co-transfection, en présence de tétracycline ou un de ses analogues, d'une lignée cellulaire, comprenant dans son génome la cassette d'expression d'un activateur de transcription, avec un adénovirus comprenant au moins un gène d'origine AAV sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline et soit un virus recombinant dérivé de l'AAV ou  
25           un plasmide d'encapsidation, portant un transgène entre les ITR de l'AAV.



51. Procédé selon la revendication 50 caractérisé en ce que l'adénovirus comprend les gènes rep et cap sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline.

52. Procédé selon la revendication 50 ou 51 caractérisé en ce que la  
5 production d'AAV est induite par la présence d'une quantité suffisante de tétracycline ou un de ses analogues.

53. Procédé selon l'une des revendications 50 à 52 caractérisé en ce que la lignée cellulaire transformée dérive de la lignée 293.

54. Procédé selon la revendication 53 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une  
10 lignée cellulaire 293 comportant dans son génome la cassette d'expression d'un activateur de transcription constitué d'un premier polypeptide capable de se lier, en présence de tétracycline ou un de ses analogues, à la séquence de régulation du promoteur inductible présent dans l'adénovirus, associé à un second polypeptide qui active la transcription.

15 55. Procédé selon la revendication 54 caractérisé en ce que le premier polypeptide est un répresseur de type sauvage de la tétracycline muté de manière à lui conférer la capacité de se lier à la séquence de régulation dudit promoteur inductible uniquement en présence de tétracycline ou un de ses analogues.

20 56. Procédé selon la revendication 55 caractérisé en ce que la mutation est une délétion, substitution et/ou délétion d'au moins un acide aminé de la séquence codant pour un répresseur tétracycline de type sauvage.

57. Procédé selon la revendication 55 ou 56 caractérisé en ce que le répresseur tétracycline muté est le répresseur sauvage Tn10 muté en au moins un de ses acides aminés localisés en position 71, 95, 101 ou 102.

25 58. Procédé selon l'une des revendications 54 à 57 caractérisé en ce qu'il s'agit du répresseur tétracycline représenté en tout ou partie en SEQ ID N°8.

59. Procédé selon l'une des revendications 54 à 58 caractérisé en ce que le second polypeptide comprend le domaine d'activation de transcription d'une protéine.

60. Procédé selon la revendication 59 caractérisé en ce qu'il s'agit de la protéine virion 16, VP16, du HSV.

5 61. Procédé selon l'une des revendications 50 à 60 caractérisé en ce que la cassette d'expression dudit activateur de transcription comprend un promoteur inductible à la tétracycline ou l'un de ses analogues.

62. Procédé selon l'une des revendications 50 à 61 caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une lignée cellulaire 293 intégrant dans son génome la cassette  
10 d'expression Op<sub>2</sub>/Tk-TetR-VP16.

63. Lignée cellulaire caractérisée en ce qu'il s'agit d'une lignée 293 intégrant dans son génome une cassette d'expression d'un activateur de transcription tel que défini en revendications 54 à 60.

64. Lignée cellulaire selon la revendication 63 caractérisée en ce qu'elle  
15 intègre dans son génome la cassette d'expression Op<sub>2</sub>/Tk-TetR-VP16.

65. Utilisation d'une lignée cellulaire selon la revendication 63 ou 64 pour produire des adénovirus ou des AAV.

66. Procédé de production d'adénovirus selon l'une des revendications 1 à 35 caractérisé en ce qu'il comprend la co-transfection d'une lignée cellulaire portant en  
20 trans les fonctions nécessaires à la complémentation de l'adénovirus et un activateur de transcription tel que défini en revendication 54 à 60.

- un premier ADN comprenant la partie gauche du génome dudit adénovirus, possédant une délétion dans la région E1, et

- un second ADN comprenant au moins la partie droite du génome dudit  
25 adénovirus, possédant au moins une région essentielle à sa réplication sous contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline, et une partie commune à celle du premier

ADN, en présence de tétracycline ou un de ses analogues, et on récupère les adénovirus produits par recombinaison.

67. Procédé selon la revendication 66 caractérisé en ce que le premier ou le second ADN porte en outre une séquence d'ADN hétérologue d'intérêt.

5           68. Composition pharmaceutique comprenant au moins un adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 35.

69. Composition pharmaceutique selon la revendication 68 comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

10           70. Promoteur inductible à la tétracycline caractérisé en ce qu'il s'agit de l'Op<sub>2</sub>/Tk.

71. Promoteur selon la revendication 70 caractérisé en ce que la séquence Op<sub>2</sub>/Tk est représentée en tout ou partie par la SEQ ID N° 5.

1/3

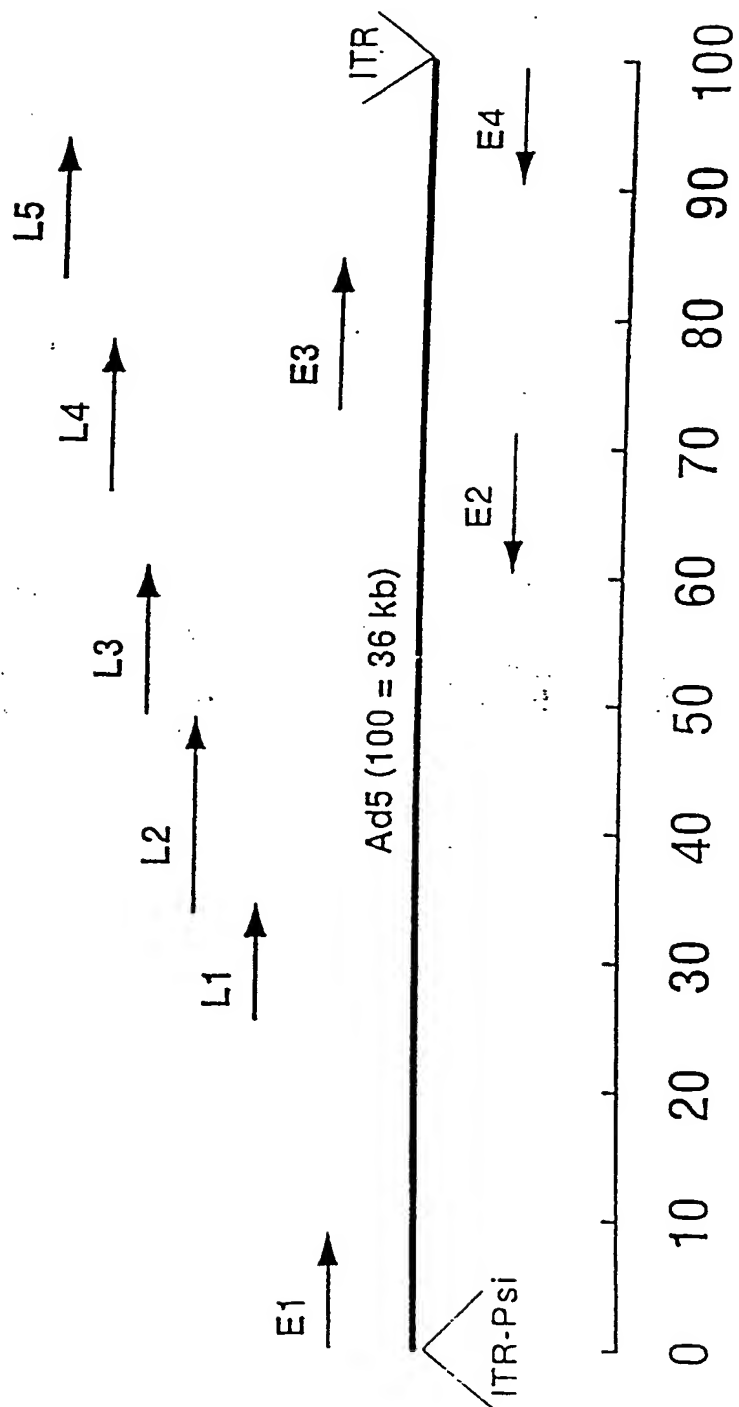


FIGURE 1

2/3

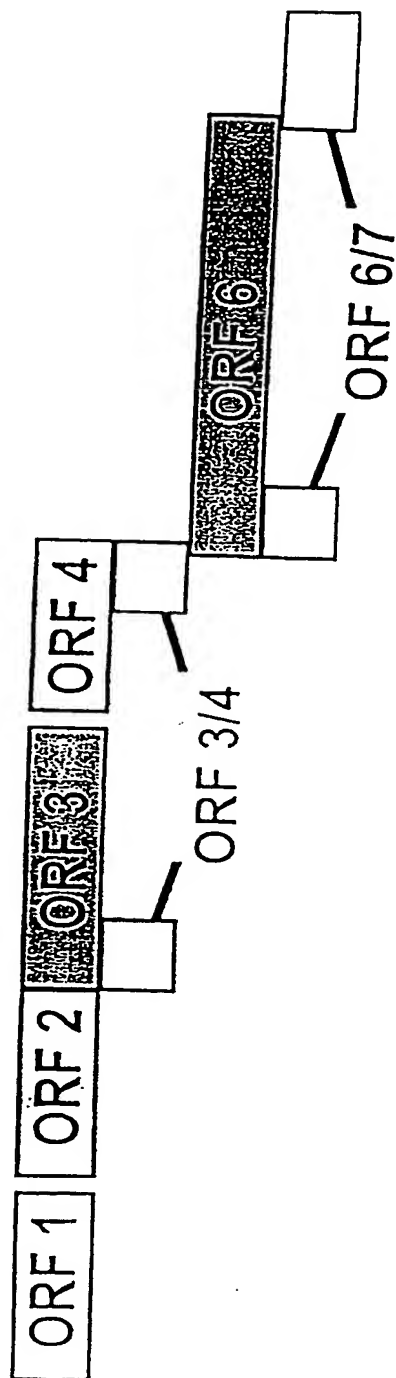


FIGURE 2

3/3

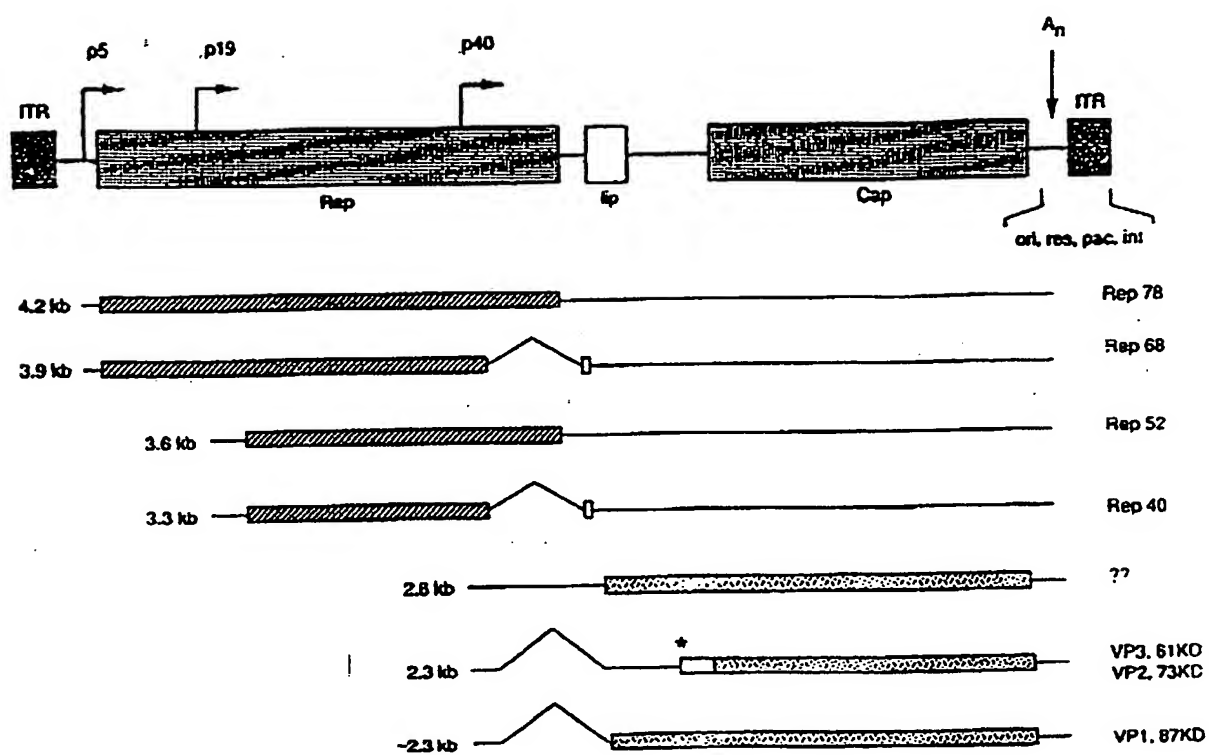


FIGURE 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PL 1/FR 96/00968

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N7/01 C12N5/10 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,95 06743 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 March 1995 see the whole document ---	1
X	GENE THERAPY, vol. 2, no. 2, 1 March 1995, pages 124-131, XP000573815 HERSH J ET AL: "MODULATION OF GENE EXPRESSION AFTER REPLICATION-DEFICIENT, RECOMBINANT ADENOVIRUS-MEDIATED GENE TRANSFER BY THE PRODUCT OF A SECOND ADENOVIRUS VECTOR" see the whole document --- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 September 1996

Date of mailing of the international search report

02.10.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/00968

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. VIROLOGY, vol. 69, no. 4, April 1995, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 2565-2573, XP002002114 H.-J. KIM ET AL.: "Tetracycline repressor-regulated gene repression in recombinant human Cytomegalovirus" see page 1565, line 4 - line 6 ---	70
A	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 21A, 1995, WILEY LISS, NEW YORK, US, page 355 XP002014053 M. GOSSEN ET AL.: "Exploiting procaryotic elements for the control of gene activity in higher eucaryotics" Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Steamboat Springs, see abstract Colorado, USA; March 26-April 1, 1995; Abstract no. C6-004 ---	1-71
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 15, no. 4, April 1995, ASM WASHINGTON, DC, US, pages 1907-1914, XP000564650 U. DEUSCHLE ET AL.: "Tetracycline-reversible silencing of eucaryotic promoters" see the whole document ---	1-71
A	DNA, vol. 8, no. 2, March 1989, MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 127-133, XP000565540 M.S.H.KO AND T.TAKANO: "A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors" see the whole document ---	1-71
A	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, January 1995, THE BRITISH COUNCIL, UK, pages 31-44, XP002014054 E.J. KREMER AND M. PERRICAUDET: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer" see page 39, line 21 - line 30 ---	1-71

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No  
 PCI/FR 96/00968

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 1, February 1995, HUMANA PRESS INC., US, pages 9-15, XP002014055 F. ROLLING AND R.J. SAMULSKI : "AAV as a viral vector for human gene therapy" see the whole document ---	1-71
A	WO,A,94 12649 (GENZYME CORP) 9 June 1994 cited in the application see the whole document ---	1-71
A	WO,A,94 28152 (TRANSGENE SA ;IMLER JEAN LUC (FR); METHALI MAJID (FR); PAVIRANI AN) 8 December 1994 see the whole document ---	1-71
A	FR,A,2 707 664 (CENTRE NAT RECH SCIENT ;ROUSSY INST GUSTAVE) 20 January 1995 see the whole document ---	1-71
A	WO,A,95 02697 (RHONE POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26 January 1995 see the whole document ---	1-71
P,X	WO,A,96 01313 (BUJARD HERMANN ;GOSSEN MANFRED (US)) 18 January 1996 see page 16, line 13 - line 39 see page 18, line 2 - line 5 see page 18, line 11 - line 18 see page 18, line 20 - page 19, line 14 see page 24, line 1 - line 2 ---	1-21,70
P,X	WO,A,95 20671 (RHONE POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3 August 1995 see the whole document ---	1
P,X	WO,A,95 23867 (RHONE POULENC RORER SA ;DENEFFLE PATRICE (FR); LATTA MARTINE (FR);) 8 September 1995 see the whole document ---	1
T	SCIENCE, vol. 268, 23 June 1995, AAAS, WASHINGTON, DC, US, pages 1766-1769, XP002014056 M. GOSSEN ET AL.: "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells" see the whole document -----	1-71

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00968

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9506743	09-03-95	AU-A- 7565694	22-03-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-A- 5734994	22-06-94
		CA-A- 2145641	09-06-94
		EP-A- 0673431	27-09-95
		JP-T- 8503855	30-04-96
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-A- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
FR-A-2707664	20-01-95	AU-A- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		WO-A- 9502697	26-01-95
		HU-A- 72558	28-05-96
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-A- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		HU-A- 72558	28-05-96
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 96/00968

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD-A-9502697		ZA-A- 9405012	20-02-95
WD-A-9601313	18-01-96	AU-A- 3092395	25-01-96
WD-A-9520671	03-08-95	FR-A- 2716682	01-09-95
		AU-A- 1539595	15-08-95
		NO-A- 962950	12-07-96
		ZA-A- 9500628	23-10-95
WD-A-9523867	08-09-95	FR-A- 2716893	08-09-95
		AU-A- 1852695	18-09-95

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des : Internationale No  
PCT/FR 96/00968

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6    C12N7/01    C12N5/10    C12N15/63    C12N15/67    C12N15/86		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6    C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,95 06743 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 Mars 1995 voir le document en entier ---	1
X	GENE THERAPY, vol. 2, no. 2, 1 Mars 1995, pages 124-131, XP000573815 HERSH J ET AL: "MODULATION OF GENE EXPRESSION AFTER REPLICATION-DEFICIENT, RECOMBINANT ADENOVIRUS-MEDIATED GENE TRANSFER BY THE PRODUCT OF A SECOND ADENOVIRUS VECTOR" voir le document en entier --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">24 Septembre 1996</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">02.10.96</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Hornig, H</div>

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. VIROLOGY, vol. 69, no. 4, Avril 1995, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 2565-2573, XP002002114 H.-J. KIM ET AL.: "Tetracycline repressor-regulated gene repression in recombinant human Cytomegalovirus" voir page 1565, ligne 4 - ligne 6 ---	70
A	J. CELL. BIOCHEM. SUPPL. 21A, 1995, WILEY LISS, NEW YORK, US, page 355 XP002014053 M. GOSSEN ET AL.: "Exploiting procaryotic elements for the control of gene activity in higher eucaryotics" Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Steamboat Springs, voir abrégé Colorado, USA; March 26-April 1, 1995; Abstract no. C6-004 ---	1-71
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 15, no. 4, Avril 1995, ASM WASHINGTON, DC,US, pages 1907-1914, XP000564650 U. DEUSCHLE ET AL.: "Tetracycline-reversible silencing of eucaryotic promoters" voir le document en entier ---	1-71
A	DNA, vol. 8, no. 2, Mars 1989, MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS,NEW YORK, US, pages 127-133, XP000565540 M.S.H.KO AND T.TAKANO: "A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors" voir le document en entier ---	1-71
A	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, Janvier 1995, THE BRITISH COUNCIL, UK, pages 31-44, XP002014054 E.J. KREMER AND M. PERRICAUDET: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer" voir page 39, ligne 21 - ligne 30 ---	1-71
	---	

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der = Internationale No  
PCT/FR 96/00968

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 1, Février 1995, HUMANA PRESS INC., US, pages 9-15, XP002014055 F. ROLLING AND R.J. SAMULSKI : "AAV as a viral vector for human gene therapy" voir le document en entier ---	1-71
A	WO,A,94 12649 (GENZYME CORP) 9 Juin 1994 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-71
A	WO,A,94 28152 (TRANSGENE SA ;IMLER JEAN LUC (FR); METHALI MAJID (FR); PAVIRANI AN) 8 Décembre 1994 voir le document en entier ---	1-71
A.	FR,A,2 707 664 (CENTRE NAT RECH SCIENT ;ROUSSY INST GUSTAVE) 20 Janvier 1995 voir le document en entier ---	1-71
A.	WO,A,95 02697 (RHONE POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26 Janvier 1995 voir le document en entier ---	1-71
P,X	WO,A,96 01313 (BUJARD HERMANN ;GOSSEN MANFRED (US)) 18 Janvier 1996 voir page 16, ligne 13 - ligne 39 voir page 18, ligne 2 - ligne 5 voir page 18, ligne 11 - ligne 18 voir page 18, ligne 20 - page 19, ligne 14 voir page 24, ligne 1 - ligne 2 ---	1-21,70
P,X	WO,A,95 20671 (RHONE POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3 Août 1995 voir le document en entier ---	1
P,X	WO,A,95 23867 (RHONE POULENC RORER SA ;DENEFLÉ PATRICE (FR); LATTI MARTINE (FR);) 8 Septembre 1995 voir le document en entier ---	1
T	SCIENCE, vol. 268, 23 Juin 1995, AAAS, WASHINGTON, DC, US, pages 1766-1769, XP002014056 M. GOSSEN ET AL.: "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells" voir le document en entier -----	1-71

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No  
PCT/FR 96/00968

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9506743	09-03-95	AU-A- 7565694	22-03-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-A- 5734994	22-06-94
		CA-A- 2145641	09-06-94
		EP-A- 0673431	27-09-95
		JP-T- 8503855	30-04-96
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-A- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
FR-A-2707664	20-01-95	AU-A- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		WO-A- 9502697	26-01-95
		HU-A- 72558	28-05-96
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-A- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		HU-A- 72558	28-05-96
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Desr : Internationale No  
PC1/FR 96/00968

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9502697		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9601313	18-01-96	AU-A- 3092395	25-01-96
WO-A-9520671	03-08-95	FR-A- 2716682	01-09-95
		AU-A- 1539595	15-08-95
		NO-A- 962950	12-07-96
		ZA-A- 9500628	23-10-95
WO-A-9523867	08-09-95	FR-A- 2716893	08-09-95
		AU-A- 1852695	18-09-95